UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

FACULTÉ DE MÉDECINE N° 82

CARACTÉRISATION DU SANG

PAR LE

DÉRIVÉ STANNEUX DE L'HÉMATOPORPHYRINE

SON APPLICATION EN MÉDECINE LÉGALE

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue à la Faculté de Médecine de Montpellier

Le 15 juin 1922

PAR

SMADJA (Samuel-Henry)

Né à Oran, le 13 juillet 1897

Pour obtenir le Grade de Docteur en Médecine

Examinateurs de la Thèse

VEDEL, professeur, *Président.*
VIRES, professeur,
GAUSSEL, agrégé,
MESTREZAT, agrégé,

Assesseurs

MONTPELLIER
Imprimerie l'ABEILLE (Coopérative Ouvrière)
14, Avenue de Toulouse. — Téléphone : 8-78

1922

CARACTÉRISATION DU SANG

PAR LE

DÉRIVÉ STANNEUX DE L'HÉMATOPORPHYRINE

SON APPLICATION EN MÉDECINE LÉGALE

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

FACULTÉ DE MÉDECINE N° 82

CARACTÉRISATION DU SANG

PAR LE

DÉRIVÉ STANNEUX DE L'HÉMATOPORPHYRINE

SON APPLICATION EN MÉDECINE LÉGALE

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue à la Faculté de Médecine de Montpellier

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Le 15 juin 1922

PAR

SMADJA (Samuel-Henry)

Né à Oran, le 13 juillet 1897

Pour obtenir le Grade de Docteur en Médecine

Examinateurs de la These

- VEDEL, professeur, *Président.*
- VIRES, professeur.
- GAUSSEL, agrégé.
- MESTREZAT, agrégé.

Assesseurs

MONTPELLIER

Imprimerie l'ABEILLE (Coopérative Ouvrière)

14. Avenue de Toulouse. — Téléphone : 8-78

1922

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Professeurs

Anatomie	MM. GILIS.
Histologie	VIALLETON.
	GRYNFELTT.
Physiologie	HEDON.
Physique médicale	N...
Chimie biologique et médicale	DERRIEN, *doyen.*
Botanique et histoire naturelle médicales	GRANEL.
Anatomie pathologique	MASSABUAU.
Microbiologie	LISBONNE.
Pathologie et thérapeutique générales	BOSC.
Pathologie interne	N...
Thérapeutique et matière médicale	VIRES.
Hygiène	BERTIN-SANS (H.)
Médecine légale et toxicologie	N...
Clinique médicale	DUCAMP.
	VEDEL.
Clinique chirurgicale	TEDENAT.
	FORGUE, *assesseur*
Clinique obstétricale	VALLOIS.
Clinique des maladies mentales et nerveuses	MAIRET.
Clinique ophtalmologique	TRUC.
Clinique des maladies des enfants	N...
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	ESTOR.
Clinique gynécologique	DE ROUVILLE.
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	MOURET.
Clinique des maladies des voies urinaires	JEANBRAU.

Honorariat

Doyens honoraires : MM. VIALLETON et MAIRET.

Professeurs honoraires : MM. E. BERTIN-SANS, RODET et IMBERT.

Secrétaires honoraires : MM. GOT et IZARD.

Chargés de Cours complémentaires

Anatomie	MM. GRYNFELLT.
Clinique propédeutique de chirurgie	RICHE.
Clinique propédeutique de médecine	RIMBAUD.
Clinique des maladies des vieillards	EUZIERE.
Clinique des maladies syphilitiques et cutanées	MARGAROT.
Médecine opératoire	SOUBEYRAN.
Pathologie chirurgicale	ETIENNE.
Accouchements	DELMAS (P.).
Pharmacologie	GALAVIELLE.
Matière médicale	CABANNES.
Stomatologie	Dr WATON.
Histologie	Dr GRANEL (F.).

Agrégés en exercice

Médecine	MM. LEENHARDT.	Chirurgie	MM. RICHE.
	GAUSSEL.		ETIENNE.
	EUZIERE.		LAPEYRE.
	RIMBAUD.	Accouchements	DELMAS (P.)
	MARGAROT.	Histoire natur.	GALAVIELLE.
Anatomie	DELMAS (J.).		CABANNES.
Chimie	MESTREZAT.	Physique	PECH.

Examinateurs de la thèse :

MM. VEDEL, profr, *président.*	MM. GAUSSEL, agrégé.
VIRES, professeur.	MESTREZAT, agrégé.

La Faculté de Médecine de Montpellier déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leur auteur ; qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation.

A LA MÉMOIRE VÉNÉRÉE DE MON PÈRE

Seul idéal vers lequel nous aspirons.

H. SMADJA.

A MA MÈRE

AUX MIENS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR VEDEL

PROFESSEUR DE CLINIQUE MÉDICALE

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

H. SMADJA.

CARACTÉRISATION DU SANG

PAR LE

DÉRIVÉ STANNEUX DE L'HÉMATOPORPHYRINE

SON APPLICATION EN MÉDECINE LÉGALE

INTRODUCTION

La chimie légale possède déjà de très nombreuses méthodes pour la recherche et la caractérisation de petites quantités de sang dans les liquides suspects, sur des linges, des vêtements, des objets divers.

Ces méthodes reposent essentiellement sur la production des cristaux d'hémine par des techniques variées ; sur l'observation de différents spectres se rapportant au pigment sanguin.

Nous ne parlerons que pour mémoire de l'observation directe des hématies qui entraîne la certitude, et nous mentionnons simplement les réactions de coloration qui ne permettent pas d'obtenir des résultats absolument concluants.

La difficulté que l'on rencontre souvent tient surtout à la petite quantité de matière à examiner, à la dilution

des liquides suspects, et très souvent aussi à la présence de taches abondamment lavées.

M. le docteur Portes, dans une communication à la Société des sciences médicales de Montpellier (février 1920), a introduit en médecine légale, dans les techniques utilisées pour la recherche du pigment sanguin, une méthode nouvelle, basée sur la formation d'un dérivé métallique de l'hématoporphyrine, le dérivé stanneux. Sous sa haute direction, nous avons contrôlé les expériences indiquées par J. Milroy et avons continué les études des propriétés du dérivé stanneux de l'hématoporphyrine. Ce dérivé est facile à obtenir par des manipulations à la portée de tout chimiste et présente un spectre caractéristique, même avec de très minimes quantités de sang ; cette méthode sensible nous a paru intéressante à généraliser.

Nous considérons surtout, dans ce travail, les deux cas pratiques suivants :

1° Essais de caractérisation du sang dans des liquides contenant ou pouvant *en contenir de très petites quantités*, ce qui équivaut à une expérimentation sur des solutions de sang très diluées ;

2° Essais sur des taches de dimensions assez considérables mais ayant subi un abondant lavage.

Nous étudierons donc l'application de la recherche du dérivé stanneux *à la caractérisation de très petites quantités de sang*. Nous exposerons les résultats acquis et donnerons les taux de dilution avec lesquelles on obtient ce dérivé et son spectre.

Pour l'étude de cette question, nous avons divisé ce travail en quatre chapitres principaux :

1° Considérations générales sur l'hématoporphyrine et ses dérivés métalliques.

2° Préparation du dérivé stanneux de l'hématoporphyrine. Spectre.

3° Application à la médecine légale.

4° Causes d'erreurs. Discussion.

CHAPITRE I

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR L'HÉMATOPORPHYRINE ET SES DÉRIVÉS MÉTALLIQUES

Notions générales sur l'hématoporphyrine. — Sa filiation à partir de l'hématine.— Constitution chimique : les quatre noyaux pyrroliques : le fer. — Isomérie avec la bilirubine. — Rapports avec la phylloporphyrine : le magnésium. — Les divers dérivés métalliques connus et étudiés. – Les recherches de Milroy. — Notes sur le dérivé stanneux.

L'hématoporphyrine est une matière colorante, *non ferrugineuse*, dérivée de l'hématine. Le tableau ci-dessous montre sa filiation ; on peut suivre les divers stades qui du pigment sanguin de l'hématie, l'oxyhémoglobine, nous amènent jusqu'à l'hématoporphyrine :

Oxyhémoglobine

Hématine — Globine (matière albuminoïde)

↓

Hémochromogène
ou Hématine réduite

↓

Hématoporphyrine

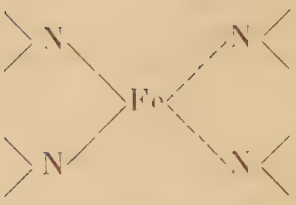
La formule chimique brute est :

$C^{32}H^{36}N^4O^6$ ou $C^{16}H^{18}N^3O^2$

Nous savons que cette formule est également celle de la bilirubine, matière colorante de la bile, mais nous verrons qu'il n'y a pas lieu de craindre des erreurs produites du fait de ce pigment, dans la formation des dérivés métalliques. Les chimistes s'accordent pour dire que la bilirubine, *isomère* de l'hématoporphyrine, n'est pas identique à elle. L'impossibilité de former des dérivés métalliques de même réaction spectrale nous fournira un argument de plus de cette différence.

L'hématoporphyrine dérive de l'hématine, substance ferrugineuse qui, traitée par un acide fort, perd *son fer* et donne l'hématoporphyrine. Ce corps possède en solution alcaline des propriétés chimiques et des spectres caractéristiques.

Les recherches de Küster et de Willstäter (1904-1914) nous permettent d'envisager pour l'hématine une formule de constitution dans laquelle un atome central de fer serait rattaché à quatre noyaux pyrroliques, de deux côtés par des valences principales, de deux autres par des valences secondaires :



$C^{32}H^{34}N^4FeO^4$

L'hématoporphyrine ne possède pas *de fer ;* on peut par une formule brute représenter ces relations avec l'hématine dont elle possède les quatre noyaux pyrroliques, mais dont elle diffère par deux molécules d'eau en plus et un atome de fer en moins :

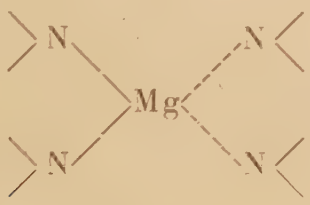
$$\underset{\text{hématine}}{C^{32}H^{34}N^4O^4Fe} + 2\,H^2O + (-\,Fe) = \underset{\text{hématoporphyrine}}{C^{32}H^{36}N^4O^6}$$

Nous avons signalé l'isomérie avec la bilirubine ; il est intéressant de comparer le tableau et les formules précédentes avec la chlorophylle et les composés qui en dérivent :

Chlorophylle
↓ après traitement par alcalis
Phytol + Chlorophylline
↓ action des alcalis à 200°
Phylline
↓ action d'un acide (le métal est éliminé)
Phylloporphyrine

Les travaux de Willstäter et de Küster nous permettent comme pour l'hématine d'admettre que la molé-

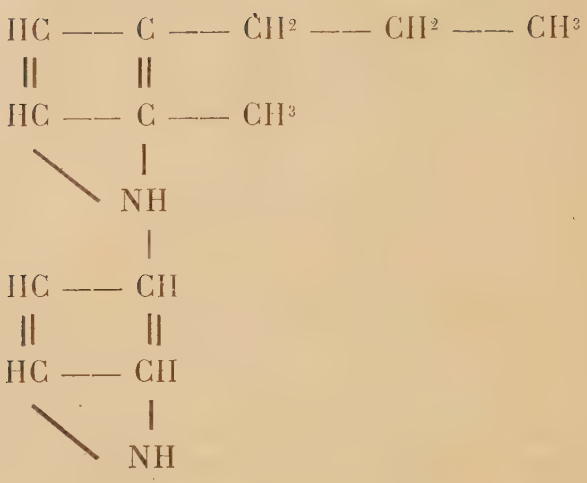
cule de chlorophylle contient elle aussi quatre noyaux pyrroliques groupés autour d'un atome de *magnésium*, et unis a lui de deux côtés par des valences principales, de deux autres par des valences secondaires :



L'examen du tableau précédent (dérivé de la chlorophylle, nous montre que, par l'action des acides, la phylline, qui contient encore du magnésium, peut perdre ce métal et donner un corps de ressemblance chimique avec l'hématoporphyrine : *la phylloporphyrine.*

La connaissance de ces notions théoriques nous paraissait indispensable pour prévoir à l'avance des objections « causes d'erreurs ».

Il fallait songer à la formation possible d'un dérivé métallique à partir des pigments végétaux, rechercher et discuter ce qui pourrait se produire dans l'examen des taches contenant de la chlorophylle. Cela d'autant plus que les deux importants pigments du monde végétal et du monde animal, oxyhémoglobine et chlorophylle, se rattachent par leurs dérivés au méthyl-propyl-pyrrol, dérivé du pyrrol :



et que déjà Schunck et Marchlewski avaient signalé un dérivé de la chlorophylle de formule très voisine de l'hématoporphyrine donnant le même hémopyrrol et des spectres d'absorption à peu près identiques.

L'hématoporphyrine est capable de former trois types distincts de composés ; elle peut :

1° S'unir avec les acides minéraux pour former des sels en se comportant comme base ;

2° Avec les bases, en se comportant comme acide ;

3° Former des composés métalliques en s'unissant avec des sels, dont le métal entre dans une combinaison organique.

L'étude de ces composés a été récemment reprise par John Alexander Milroy dans le « Biochemical Journal » et par M. le docteur Portes dans les laboratoires de chimie biologique de la Faculté de médecine de Montpellier. Il a été étudié les composés obtenus avec le nickel, le cobalt, le fer, le zinc, le cadmium, le cuivre,

l'étain, le plomb... De ces expériences, il ressort que le dérivé stanneux est le plus sensible.

Nous nous sommes proposé de reprendre ces expériences, de poursuivre cette étude et de l'appliquer dans la recherche du sang dans les différentes expertises médico-légales, ce dérivé étant susceptible de se former et de donner un spectre caractéristique alors qu'il n'est déjà plus possible d'obtenir le spectre qui jusqu'à aujourd'hui était considéré comme le plus sensible : celui de l'*hémochromogène*.

CHAPITRE II

OBTENTION DU DÉRIVÉ STANNEUX A PARTIR DE L'OXYHÉMOGLOBINE

Méthode directe. — Conditions d'application. — Méthode de Milroy pour augmenter la sensibilité du révélateur. — Techniques : Le relargage. — Description des appareils utilisés. — Résultats. — Les spectres. — Position des bandes d'absorption. — Sensibilité de la méthode.

Il ressort des recherches de J.-A. Milroy que l'hématoporphyrine, capable de se combiner avec certains métaux (cuivre, cadmium, étain, etc.) en solution acétique, ne le fait pas en présence d'un acide minéral libre. Chaque fois qu'on fera agir sur l'hématoporphyrine, dans l'acide acétique glacial, des sels métalliques d'acides minéraux, il faudra faire intervenir une quantité au moins équivalente d'acétate de sodium.

La technique générale à utiliser sera donc la suivante: On fera réagir sur une solution d'hématoporphyrine, en milieu acétique, un sel métallique donné, et on complé-

tera la préparation par l'action de $CH^3CO.ONa$, si le sel est le produit de l'union d'un métal avec un acide minéral.

Voici quelques expériences à partir d'une solution d'oxyhémoglobine :

Expérience I

Cette expérience est destinée à montrer les étapes intermédiaires dans la formation du dérivé stanneux.

Premier temps. — On met dans un tube à essais 10 cc. d'acide acétique glacial dans lesquels on fait tomber trois gouttes de sang défibriné. La solution est portée à l'ébullition. En examinant au spectroscope, on aperçoit *le spectre d'absorption de l'hématine acide.*

Deuxième temps. — On ajoute deux à trois gouttes d'une solution deux fois normale de protochlorure d'étain ($SnCl^2$) et on porte encore à l'ébullition que l'on maintient une minute environ. On filtre pour séparer le précipité s'il s'en est formé et on voit dans le filtrat *le spectre de l'hématoporphyrine acide.*

Troisième temps. — On jette dans ce liquide quelques cristaux d'acétate de sodium, on recommence l'ébullition une minute. On filtre après refroidissement, en remarquant le changement de coloration du liquide qui est devenu rose brillant.

L'observation de ce changement de coloration et l'ap-

parition de cette teinte rose sont un indice de la réussite des manipulations.

- En examinant au spectroscope sous une épaisseur de douze millimètres, on aperçoit les deux bandes d'absorption du dérivé stanneux qui ressemblaient par leurs positions respectives à celles de l'oxyhémoglobine.

Leur position moyenne est dans les longueurs d'onde :

1re bande = 576.

2me bande = 538.

Expérience II

Milroy a montré, et nous avons tenu à le vérifier nous-même en utilisant sa technique, que le spectre ainsi obtenu était plus sensible que celui de l'hémochromogène.

A titre de comparaison, nous avons réalisé les deux expériences décrites ci-dessous, en utilisant une solution de sang défibriné à 1 p. 2000. On constate la présence du spectre du dérivé stanneux, alors qu'il n'est plus possible de voir celui de l'hémochromogène.

Premier temps. — *Essai du spectre de l'hémochromogène.*

Dix centimètres cubes d'une solution de sang à 1 pour 2000, chauffés avec 1 cc. d'ammoniaque, traités par le sulfure d'ammonium 1 cc. et portés à 20 cc. par addition d'eau distillée *ne montrent pas le spectre de l'hémochromogène* sous une épaisseur de 20 millimètres.

Deuxième temps. — *Même essai avec le dérivé stanneux.*

Dix centimètres cubes de cette solution, traités comme il a été indiqué plus haut, additionnés d'abord d'acide acétique glacial 9 cc., portés à l'ébullition, puis traités par quatre ou cinq gouttes de protochlorure d'étain (en solution deux fois normale) et quelques cristaux d'acétate de soude, montrent encore sous une épaisseur de 20 millimètres un spectre caractéristique.

Ces expériences représentent les limites des dilutions dans lesquelles on peut apercevoir les différences de sensibilité des deux méthodes.

La difficulté dans l'application de la méthode du dérivé stanneux tient surtout à la réalisation de la condition nécessaire pour la formation du composé. L'action de l'acétate de sodium est indispensable et on doit toujours faire agir ce sel pour éliminer l'action empêchante que crée, même une très petite quantité, d'acide minéral libre.

J. Milroy a étudié une nouvelle méthode pour accroître la sensibilité de la réaction. Elle est basée sur la propriété que possède le phénol d'entraîner l'hématine, quand il est ajouté à une solution qui en contient.

Le principe de cette nouvelle méthode est le suivant : Ajouté à une solution même très diluée de sang, l'acide phénique vers 90° environ se mélange intimement au liquide, capte le pigment sanguin et l'entraîne ensuite avec lui si on le « relargue ».

Le « relargage » (*ausalzen* des auteurs allemands, *salting* des auteurs anglais) consiste ici à extraire le phénol du liquide où il est réparti en le ramenant à la surface, par l'action du sulfate d'ammoniaque à saturation du NaCl à saturation, etc.

Ces deux propriétés importantes peuvent être utilisées pour réunir dans un tout petit volume de phénol tout le

pigment sanguin contenu dans un liquide et pour le ramener à la surface par le relargage.

Nous devons préciser que le phénol n'apportera aucune gêne dans la suite des manipulations et du spectre.

Expérience III

Reprenons la solution de sang utilisée précédemment 1 pour 2000, — à titre d'expérience, prélevons dans un petit ballon 100 centicubes auxquels nous ajouterons 5 centicubes de phénol, — ajoutons le flacon pour mélanger les corps en présence. Portons au bain-marie à 90° pendant quelques minutes, les liquides se mélangent et le contenu d'abord troublé devient limpide. Après dix minutes de contact, il suffira de verser le contenu du ballon dans une grande éprouvette contenant du sulfate d'ammoniaque à saturation pour voir le phénol remonter rapidement à la surface, coloré en brun par l'hématine qu'il entraîne.

Sur cette petite quantité de phénol décanté, nous pouvons reprendre les opérations pour l'obtention du dérivé stanneux, à savoir : ajouter 2 à 3 centicubes d'acide acétique glacial, porter à l'ébullition tranquille 2 à 3 minutes, laisser tomber d'abord 2 à 3 gouttes de $SnCl^2$ et, après une nouvelle ébullition de 2 minutes, quelques cristaux d'acétate de soude.

Le spectre observé sous une épaisseur de 10 millimètres présente les deux bandes d'absorption caractéristiques.

Le phénol représente donc un excellent moyen de réunir dans un tout petit volume toute l'hématine con-

tenue dans une solution. Cette propriété paraît intéressante à appliquer en médecine légale et pourra être utilisée toutes les fois qu'on voudra réunir la matière colorante du sang, contenue dans une solution, soit pour mieux voir les divers spectres, soit pour effectuer la préparation des cristaux d'hémine.

Méthode directe

Pour obtenir le dérivé stanneux par la méthode directe, trois réactifs sont nécessaires :

1° De l'acide acétique glacial ;

2° De l'acétate de sodium en cristaux ;

3° Une solution 2 fois normale de $SnCl^2$ qu'on peut préparer à l'avance.

Le chlorure stanneux se dissout facilement par l'addition d'une certaine quantité d'acide chlorhydrique.

Nous avons essayé dans nos expériences de suppléer à cette préparation, qui n'est pas très stable et s'altère à la longue, par la préparation extemporanée de la solution de protochlorure d'étain en dissolvant au moment de l'emploi quelques cristaux de $SnCl^2$ dans l'acide chlorhydrique. La préparation du dérivé stanneux est réalisée, mais il faut avoir soin d'ajouter une grande quantité d'acétate de sodium.

Pour supprimer cette action empêchante de l'acide minéral dont il a été parlé plus haut, nous avons essayé de dissoudre extemporanément le sel stanneux dans l'acide trichloracétique. La dissolution se fait rapidement à chaud et on obtient le dérivé. Il paraît malgré

tout préférable d'utiliser la solution deux fois normale en la préparant en très petites quantités.

Méthode par relargage

1° *Réactifs.* — Dans la méthode par relargage, on doit employer l'acide phénique pur, rigoureusement incolore. S'il présentait une teinte légèrement brune, on doit lui faire subir une nouvelle distillation avant l'emploi.

On prépare aussi une solution de sulfate d'ammoniaque saturé.

2° *Appareils.* — Pour séparer facilement le phénol relargué, nous nous sommes servi tout d'abord d'une boule à décantation. Mais nous lui préférons un petit appareil décrit dans le « Physiological Chemistry de W. S. Cole ».

Il consiste essentiellement dans une éprouvette de dimensions variables, suivant les quantités de liquide sur lesquelles on opère, fermée à sa partie supérieure par un bouchon percé de deux trous. Dans l'un passe un long tube recourbé à son extrémité qu'on amène au contact de la surface inférieure du phénol, l'autre donne passage à un tube qui sert au passage de l'air. Il suffira d'amener l'extrémité du tube recourbé au niveau du phénol et de souffler par l'autre tube pour décanter la quantité que l'on voudra.

Sensibilité de la méthode

Voici d'après Milroy la technique et le degré de sensibilité de cette méthode :

100 grammes de sang de bœuf contiennent habituellement 0,03805 de fer (Aberhalden). Le sang de bœuf utilisé dans cette expérience avait un poids spécifique de 1050; donc 100 gr. contiennent 0,03995 de fer et 139 gr. 8 contiendraient 0,05584 de fer. Ce qui équivaudrait à une solution de 100 centicubes de fer N/100.

On ajoute à 139,8 de sang de bœuf, 60 gr. 2 d'eau et on fait le mélange, ce qui donne une solution de 200 centicubes. On a, par rapport au fer, une solution N/200. On prend 10 centicubes de cette solution que l'on complète avec 250 centicubes d'eau ; ce qui correspond à une solution d'oxyhémoglobine N/5000.

On prend 2 cc. 5 de cette solution N/5000 et on complète à 500 cc. avec de l'eau distillée; le titre de cette solution est maintenant $N \times 10^{-6}$ ou $N \times 1/10^{6}$.

On prend enfin 150 cc. de cette solution dans un flacon de 250 grammes et on ajoute 6 gr. 3 de phénol, On porte au bain-marie doucement et on maintient le tout à 90° pendant 20 minutes. Puis on sature la solution avec du sulfate d'ammoniaque 114 grammes. Le phénol relargué monte à la surface du flacon, coloré en brun par l'hématine qu'il contient. On ajoute encore du sulfate d'ammoniaque pour achever le relargage.

On prend une petite quantité de ce phénol, on le met dans un tube, on filtre et on mêle avec la moitié de son

volume d'acide acétique glacial et on porte près de l'ébullition.

On ajoute 4 à 6 gouttes de protochlorure d'étain ; on fait bouillir deux minutes ; on ajoute des cristaux d'acétate de sodium, on fait bouillir et on filtre.

En examinant le liquide filtré sous une épaisseur de onze millimètres, on voit le spectre du dérivé stanneux. Il serait donc possible, à l'aide de cette méthode, de découvrir le sang au taux de $1/5 \times 10^6$; cette réaction serait de beaucoup **la plus sensible des réactions connues et la plus sûre.**

CHAPITRE III

APPLICATION A LA MÉDECINE LÉGALE

Cas des solutions très diluées dans lesquelles il est difficile de caractériser le pigment sanguin. — Cas des taches grandes, mais lavées. — Essai pour augmenter la puissance de la sensibilité. — Fluorescence.

Les techniques et les indications que nous avons données dans le paragraphe précédent nous permettent d'envisager directement un cas d'expertise médico-légale.

Cas de liquides suceptibles de contenir des taches de sang.

Nous pouvons appliquer ici la méthode très sensible déjà décrite : action et relargage du phénol.

Voici, après essais, la technique que nous proposons :

Prendre une certaine quantité de ce liquide, 100 à 200 cc. par exemple, si on en possède une certaine quantité :

faire agir le phénol sur la totalité ou mieux successivement sur diverses fractions de façon à collecter au maximum toute l'hématine, s'il en existe. Si on possède une quantité moindre, on peut compléter le volume à 100 ou 200 cc. par addition d'eau distillée bouillie. La dilution du liquide n'a pas d'importance (dans une certaine mesure, cela s'entend) puisque le phénol en se relarguant ramène avec lui tout le pigment sanguin.

Ajouter alors 3 à 5 cc. de phénol pur et rigoureusement incolore par 100 cc. de liquide à examiner. Mélanger par agitation et porter la fiole au bain-marie, lentement à 90-95°. Le liquide se trouble, devient lactescent, se clarifie. Après quelques minutes (dix environ), retirer la fiole du bain-marie et verser le contenu dans l'appareil décrit précédemment et dans lequel on a mis à l'avance une quantité de solution de sulfate d'ammoniaque saturé, égale au volume du liquide examiné.

Le phénol relargué monte à la partie supérieure de l'éprouvette, d'où on peut le décanter. Continuer les opérations comme il a été indiqué précédemment.

On examine alors au spectroscope. Pour augmenter la sensibilité de la réaction, on peut employer le spectroscope de Théry, qui permet d'examiner le liquide sous de grandes épaisseurs et d'avoir, juxtaposée au spectre obtenu, l'image d'un spectre préparé à l'avance à partir du sang.

Avec cet appareil, on peut verser le liquide dans des tubes de 10, 20, 50 centimètres de longueur dont on diminue la capacité de moitié par l'introduction d'une baguette d'ébonite (Procédé de M. le professeur Derrien).

Cas des taches lavées.

On divise la tache en petits fragments que l'on met successivement en contact avec une petite quantité d'acide acétique cristallisable à l'ébullition tranquille. On épuise ainsi toute la tache. Si, par l'ébullition, le volume de l'acide acétique diminuait, on maintiendrait, par additions successives, le volume initial.

Il ne reste plus qu'à ajouter 2 à 3 gouttes de chlorure stanneux et quelques cristaux d'acétate de soude.

Essais d'obtention de préparations durables du spectre stanneux sur la tache elle-même.

La méthode que nous venons d'étudier est difficile à appliquer directement sur la tache elle-même ou sur un fil. Il était intéressant pour le dérivé stanneux d'essayer ce que MM. les professeurs Derrien et Sarda ont réalisé par l'hémochromogène (méthode : Baume de Canada-Pyridine) en utilisant le microscope. Nous avons pu réussir en immergeant le fil ou la tache dans l'acide acétique, en continuant très rapidement la suite des opérations. On obtient le spectre, mais nous préférons, dans le cas de taches non lavées, la recherche du spectre de l'hémochromogène, et si cette méthode ne réussit pas nous conseillons, plutôt que d'opérer sur la tache elle-même, d'essayer la dissolution du pigment dans l'acide acétique et de rechercher le spectre dans le liquide après essai de la technique.

Essai pour augmenter la puissance de sensibilité.

L'hématoporphyrine étant *une substance fluorescente* (fluorescence à laquelle sont dues des actions photodynamiques très importantes), nous avions essayé, sur les indications de M. le professeur Derrien, d'accroître la sensibilité de la réaction, de rechercher si la solution du dérivé stanneux de l'hématoporphyrine ne présenterait pas le phénomène caractéristique fluorescent des solutions alcalines et mieux d'hématoporphyrine.

En opérant dans les meilleures conditions et en recherchant la fluorescence (1) par le procédé de Brewster (concentration à l'aide d'une loupe d'un faisceau lumineux, sur le liquide à examiner), nous n'avons eu malheureusement aucun résultat positif.

Cette déception nous a tout de même amené à rechercher si dans la préparation du dérivé stanneux, au stade de la filtration contenant de l'hématoporphyrine acide, nous n'aurions pas une fluorescence typique. Cette fluorescence existe naturellement, mais nous n'avons pas encore déterminé avec précision le degré de sensibilité de cette méthode de recherche. Nous nous proposons de communiquer ultérieurement le résultat des expériences en cours.

---

(1) Cette fluorescence rouge des solutions d'hématoporphyrine acide a été utilisée pour la recherche de ce pigment dans les urines (Thèse Lafont, Montpellier 1921).

CHAPITRE IV

DISCUSSION DES CAUSES D'ERREURS

Bilirubine. — Chlorophylle. — Taches de méconium. — Urines à hémoglobine, à hématoporphyrine.

Nous avons vu que la bilirubine était un isomère de l'hématoporphyrine. On pouvait se demander si le pigment biliaire ne pouvait pas donner un dérivé stanneux.

La bilirubine est très soluble dans le phénol, et à l'état pur ne donne pas de spectre; mais quand elle est préparée à partir des bilirubinates alcalins, de la bile des herbivores, elle est souvent accompagnée de choléhématine qui possède deux bandes d'absorption situées à droite et à gauche de la raie D du sodium.

En opérant sur des solutions plus ou moins concentrées de bilirubine dissoute dans l'acide phénique et en appliquant rigoureusement la technique indiquée plus haut, nous n'avons pas obtenu de spectre et celui de la choléhématine, s'il existe au début de l'expérience, disparaît.

En appliquant également la technique sur des liquides ou des taches contenant le pigment chlorophyllien, il nous a été impossible de retrouver un spectre ressemblant à celui du dérivé stanneux de l'hématoporphyrine.

Nous avons énoncé dans le premier paragraphe les raisons qui nous avaient incité à faire cette recherche.

L'hypothèse d'une erreur possible provenant de la formation d'un dérivé stanneux dans le cas de taches végétales à partir du groupe pyrrolique est à éliminer.

Il est d'ailleurs possible de prévoir cette objection, en dissolvant un peu de la tache dans le phénol ; on observe alors la bande dans le rouge, qui est caractéristique de la chlorophylle.

Mentionnons, pour être complet, le cas de taches de méconium qui contient de l'hématoporphyrine, celui des taches provenant des cas d'hématoporphyrinurie ou d'hémoglobinurie. Mais, dans ces cas, il y a d'autres éléments pour l'expertise qui permettent une différenciation.

Nous avons indiqué au cours de ce travail quelques projets de recherches, en particulier l'utilisation des propriétés fluorescentes de l'hématoporphyrine, propriétés que nous nous proposons d'étudier plus minutieusement au cours de nos recherches ultérieures.

CONCLUSIONS

En résumé :

1° Le phénol, qui capte le pigment sanguin, sera utilisé toutes les fois qu'on voudra réunir la matière colorante du sang dans un liquide.

2° La recherche du dérivé stanneux de l'hématoporphyrine doit être tentée chaque fois que les autres méthodes de caractérisation du sang auront échoué.

3° Elle nous paraît peu susceptible de causes d'erreurs, car la suite complexe des traitements qu'on fait subir aux liquides en expérience pour aboutir à l'observation d'un spectre, dont les bandes d'absorption ont une position nettement définie, est le plus sûr garant de son exactitude.

4° Cette méthode rigoureusement **sûre est la plus sensible des méthodes de recherche spectrale connue aujourd'hui et la plus exacte.**

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

Aberhalden. — Zeits. physiol. Chemie, 1898.

Baly. — Spectroscopy, 1905.

Gozl. — Haematoporph. bei Blutvergiftung (Wiener klin. Wochens., n° 50).

Burker et Erster. — Familiare Haematoporphyrinurie und ihr Lusammenhang. (Klein. Ther. Wochens., n° 36, 1912).

Grynfeltt (Ed.) et Lafont (R.).— Sur la porphyrinurie expérimentale. Lésions du foie dans l'intoxication aiguë par le sulfonal (Soc. Biol., juillet 1921).

Gunther.— Haematoporph. (Deutsch. Archiv. für klin. Med., 1912).

Hegler-Fraenkel et Schumm. — Zur Lehre von der Haemotoporphyria congenita (Deutsch. med. Wochens., n° 18).

Hoagland (R.) et Mac Bryde. — Autolysis in ox muscle (Journal of agricult. re earch., vol. 6 et 7, 1916).

Lafont (R.) et Portes (F.).— Essai de porphyrinurie expérimentale (Soc. Biol., juillet 1921).

Mathews. — Practical physiological Chemistry, 1920.

Milroy. — Observations on some metallic compounds of Haematoporph. (Biochemical Journ., décembre 1918).

Portes (F.). — Société des sciences médicales de Montpellier, 1920.

Willstater et Stoll. — Untersuch. über Chlorophyll., 1913.

En ma qualité de Censeur de tour, j'ai lu la Thèse ayant pour titre :

Caractérisation du sang par le dérivé stanneux de l'hématoporphyrine (son application en médecine légale),

par Henry Smadja.

Je pense que la Faculté peut en permettre l'impression.

Montpellier, le 13 juin 1922.

Le Professeur,

VEDEL.

Vu :

Montpellier, le 13 juin 1922.

Le Doyen.

E. DERRIEN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Montpellier, le 13 Juin 1922.

Le Recteur,

Jules COULET.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

Introduction 7

Chapitre I 10

Chapitre II 16

Chapitre III 25

Note sur la fluorescence. Procédé de recherche 28

Chapitre IV 29

Conclusions 31

Index bibliographique 33

Table des matières 35

SERMENT

En présence des Maîtres de cette École, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent, et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque!